

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 571 441**

21 Número de solicitud: 201431737

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

24.11.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

25.05.2016

Fecha de la concesión:

28.02.2017

45 Fecha de publicación de la concesión:

07.03.2017

73 Titular/es:

**INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA -
FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ (75.0%)**

**Avda. Reyes Católicos, 2
28040 Madrid (Madrid) ES y**

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID (25.0%)

72 Inventor/es:

TARIN CEREZO, Carlos Antonio;

BURILLO IPIENS, Elena;

LLAMAS GRANDA, Patricia;

PASTOR VARGAS, Carlos;

BLANCO COLIO, Luis Miguel;

EGIDO DE LOS RÍOS, Jesús y

MARTÍN VENTURA, José Luis

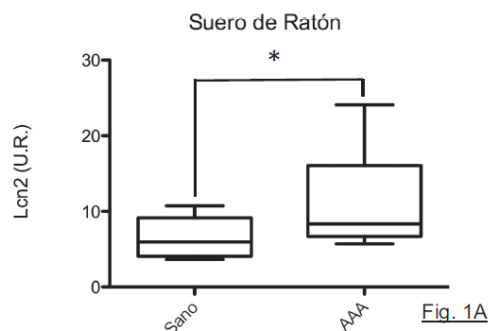
74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

54 Título: **Uso de moléculas que reducen los niveles de lipocalina-2 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de aneurisma aórtico abdominal (AAA)**

57 Resumen:

Uso de moléculas que reducen los niveles de lipocalina-2 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de aneurisma aórtico abdominal (AAA). Uso de un anticuerpo capaz de unirse a lipocalina-2 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de aneurisma aórtico abdominal. Uso de una molécula de ácido nucleico antisentido capaz de inhibir la expresión del gen de lipocalina-2 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de aneurisma aórtico abdominal.



ES 2 571 441 B1

DESCRIPCIÓN

**USO DE MOLÉCULAS QUE REDUCEN LOS NIVELES DE LIPOCALINA-2 PARA
LA FABRICACIÓN DE UN MEDICAMENTO PARA EL TRATAMIENTO DE
ANEURISMA AÓRTICO ABDOMINAL (AAA)**

5

SECTOR TÉCNICO

La invención se encuadra en el campo médico del tratamiento del Aneurisma Aórtico Abdominal (AAA).

10 **ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN**

El aneurisma de aorta abdominal (AAA) es una enfermedad vascular en la que la aorta pierde su capacidad de regular su diámetro produciéndose una dilatación permanente del vaso que puede desembocar en la ruptura del mismo.

15 En la patogénesis de los AAA se encuentran implicados numerosos procesos y tipos celulares. La importancia de las células inflamatorias en el progreso de la enfermedad ha sido probada en numerosos estudios. Algunos de sus efectos perniciosos ocurren a través de la degradación proteolítica de la elastina de la capa media y del colágeno intersticial mediante la secreción de metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs)
20 y la liberación de citoquinas pro-inflamatorias y especies reactivas de oxígeno entre otros compuestos. Entre otras células inflamatorias, los neutrófilos participan tanto en la formación como en la expansión del aneurisma.

Las terapias actuales de AAA comprenden ácido acetilsalicílico (100mg) y un inhibidor
25 de la hidroximetilglutaril CoA reductasa (20/40mg) una vez al día; en caso de tener algún factor de riesgo adicional, se aplicaría el tratamiento correspondiente. Si tuviera hipertensión arterial, se trataría con un antihipertensivo; el fallo cardíaco se trata con diuréticos, inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina, beta bloqueantes y en algún caso, con potasio y digoxina.

30

La lipocalina-2 (Lcn2) es una proteína soluble de 25 KDa cuya función inicial descrita estaba relacionada con la inmunidad innata ya que es capaz de inhibir el crecimiento bacteriano. Además de su función como transportador se ha descrito muchas otras funciones tales como factor de crecimiento, regulador del metabolismo lipídico,
35 modulador de la función de las células polimorfonucleares y preservador de la

actividad gelatinasa de neutrófilos. Aunque inicialmente su secreción fue descrita por neutrófilos, se conoce hoy en día que es producida por otros tipos celulares tales como hepatocitos, células epiteliales, células epiteliales tubulares o vasculares de músculo liso, entre otras. La Lcn2 se ha descrito como un buen biomarcador de daño renal agudo (Chakraborty, S. y col., "The multifaceted roles of neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) in inflammation and cancer. *Biochim Biophys Acta*, 2012. 1826(1): p. 129-69).

La Lipocalina 2 (o NGAL) se ha asociado a la prevención y tratamiento de fallo cardíaco (WO 2012/072820 A1). Sin embargo, el fallo cardíaco y el AAA son dos entidades distintas, ya que mientras el fallo cardíaco afecta al corazón, el AAA se desarrolla en la aorta a la altura de la zona abdominal. La causa más común del fallo cardíaco es la arteriopatía coronaria, un estrechamiento de los pequeños vasos sanguíneos que suministran sangre y oxígeno al corazón. En cambio, el AAA es una dilatación de la aorta abdominal de etiología desconocida.

Lcn2 está incrementada en el plasma de pacientes con AAA, que se acumula dentro del trombo intraluminal del aneurisma y es liberada al medio extracelular (Ramos-Mozo, P. y col., "Increased plasma levels of NGAL, a marker of neutrophil activation, in patients with abdominal aortic aneurysm". *Atherosclerosis*, 2012. 220(2): p. 552-6). Esta publicación se considera la más cercana de la técnica, porque identifica Lcn2 como un marcador circulante que podría servir potencialmente para el diagnóstico de AAA. Es importante destacar que el aumento de los niveles extracelulares de Lcn2 pueden reflejar un estado de activación sistémica o local por parte de los neutrófilos y/o un daño a nivel renal, pero en cualquier caso, esta asociación entre Lcn2 circulante y AAA no implica causalidad y por lo tanto, no demuestra que la inhibición de Lcn2 pueda tener un efecto beneficioso en la prevención o tratamiento del AAA. De hecho, el potencial uso terapéutico de inhibir o bloquear Lcn2 en AAA no ha sido previamente demostrado.

El problema de la técnica es encontrar una nueva terapia efectiva de AAA. La solución que propone la presente invención es utilizar Lcn2 como diana terapéutica inhibiendo su expresión o neutralizando su función en el paciente afectado, en particular por un anticuerpo policlonal.

35

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona el uso de un anticuerpo capaz de unirse a lipocalina-2 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de aneurisma aórtico abdominal.

En la presente invención se proporciona el uso de un anticuerpo neutralizante de lipocalina-2 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de aneurisma aórtico abdominal.

De forma preferible, dicho anticuerpo es un anticuerpo policlonal.

Este uso también puede definirse como un anticuerpo capaz de unirse a lipocalina-2 para uso en el tratamiento de aneurisma aórtico abdominal.

Asimismo, también puede definirse como un método de tratamiento del aneurisma aórtico abdominal que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo capaz de unirse a lipocalina-2, junto con excipientes farmacéuticamente aceptables.

La presente invención demuestra que la deficiencia de Lcn2 disminuye la expansión aneurismática, en particular se ha demostrado que los ratones deficientes para la proteína Lcn2 presentaron menor desarrollo aneurismático. También se ha demostrado que el tratamiento con un anticuerpo policlonal neutralizante anti-Lcn2 disminuye las lesiones aneurismáticas.

Esta demostración permite concluir que una molécula de ácido nucleico anti-sentido que inhiba la expresión del gen de lipocalina-2 es útil en el tratamiento de aneurisma aórtica abdominal.

Por tanto, otra realización de la invención es el uso de una molécula de ácido nucleico anti-sentido capaz de inhibir la expresión del gen de lipocalina-2 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de aneurisma aórtico abdominal.

De forma preferible, dicho ácido nucleico es un ARN interferente silente.

Este uso también puede definirse como una molécula de ácido nucleico anti-sentido capaz de inhibir la expresión del gen de lipocalina-2 para uso en el tratamiento de aneurisma aórtico abdominal.

5

Asimismo, también puede definirse como un método de tratamiento del aneurisma aórtico abdominal que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de ácido nucleico anti-sentido capaz de inhibir la expresión del gen de lipocalina-2, junto con excipientes farmacéuticamente aceptables.

10

Los ejemplos aportados en la presente solicitud demuestran que la deficiencia de Lcn2 disminuye la expansión aneurismática. Se ha validado que en el modelo murino la inducción de un aneurisma induce un aumento de Lcn2 circulante en sangre (Figura 1A), y los ratones con aneurisma presentan por tanto mayores niveles circulantes de Lcn2 respecto a ratones sanos.

15

Seguidamente, se muestra que los ratones deficientes para la proteína Lcn2^{-/-} presentaron menor desarrollo aneurismático respecto a los ratones de fenotipo salvaje C57BL/6J o control (Figura 1B). Sólo 1 de los 11 ratones Lcn2 deficientes desarrollaron AAA acorde a la definición establecida en el modelo inicial (Pyo, R. y col., "Targeted gene disruption of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) suppresses development of experimental abdominal aortic aneurysms". J Clin Invest, 2000. 105(11): p. 1641-9); mientras que 10 de los 12 animales de fenotipo salvaje mostraron que tenían aneurisma. El diámetro aórtico de los ratones deficientes para Lcn2 resultó ser significativamente menor que los de fenotipo salvaje. Ninguno de los ratones infundidos con suero salino, ya fueran C57BL/6J o Lcn2^{-/-}, desarrollaron aneurismas y tuvieron un incremento aórtico similar. Mediante cuantificación de la tinción de Verhoeff Van Gieson se observó que la degradación de las capas de elastina (Figura 1C) era también menor en los ratones Lcn2^{-/-} comparados con los de fenotipo salvaje. Por último, mediante cuantificación de la tinción de α -actina se demostró que la preservación de las células vasculares (Figura 1D) era mayor en el ratón deficiente para lipocalina-2 respecto a los ratones de fenotipo salvaje.

20

25

30

35

Las lesiones en los ratones deficientes para Lcn2^{-/-} demostraron tener menor contenido inflamatorio. Se demostró que las lesiones en los ratones KO tenían menor

número de neutrófilos en los aneurismas respecto a los de fenotipo salvaje (cuantificación mediante marcaje de Ly.6B-2, Figura 2A), mientras que no hubo cambios en el contenido de linfocitos (CD3, Figura 2B) ni en monocitos-macrófagos (MOMA2, Figura 2C). La disminución de neutrófilos se ha relacionado directamente
5 con una disminución de la expansión aneurismática (Circulation. 2005 Jul 12; 112(2):232-40). Además, los ratones deficientes para Lcn2^{-/-} poseen menor actividad de las enzimas metaloproteinasas de matriz extracelular (MMP). La remodelación del vaso es un proceso fundamental en la aparición y el desarrollo del aneurisma en el que las enzimas metaloproteinasas juegan un papel importante. Mediante la inyección
10 de una sonda activable por MMPs se determinó la actividad de estas enzimas en el aneurisma; mostrando que los ratones Lcn2^{-/-} tienen menores niveles de actividad MMP en el aneurisma comparado con los ratones de fenotipo salvaje (Figura 2D).

El tratamiento con anticuerpo neutralizante anti-Lcn2 disminuye las lesiones
15 aneurismáticas. Tras la caracterización del anticuerpo se realizó una nueva serie de experimentos de inducción de aneurismas en animales C57BL/6J tratándolos o con el anticuerpo control (IgG) o con el anticuerpo terapéutico (anti-Lcn2). Al igual que en la comparación de ratones de fenotipo salvaje y deficientes para Lcn2, los ratones tratados con el anticuerpo anti-Lcn2 presentaban menor incidencia de aneurismas que
20 los ratones tratados con el anticuerpo control. El análisis de las lesiones mostraron que los ratones tratados con el anti-Lcn2 presentaban menor incremento del diámetro aórtico que los ratones tratados con el anticuerpo control (Figura 3A). Al contrario que en la comparación de los ratones KO respecto a los de fenotipo salvaje, la tinción no demuestra que la degradación de las capas de elastina fuera menor en los ratones
25 tratados con el anticuerpo terapéutico comparados con los tratados con el anticuerpo control (Figura 3B). En cambio, se observó que la preservación de las células vasculares era mayor en el ratón tratado anti-Lcn2 respecto al tratado con IgG (Figura 3C).

30 El análisis de neutrófilos en las lesiones aneurismáticas indicó que el tratamiento anti-Lcn2 disminuía la infiltración de este tipo celular (Figura 4A) y al igual que en modelo KO, el tratamiento con el anticuerpo terapéutico disminuía la actividad MMP asociada al daño vascular (Figura 4B).

El tratamiento terapéutico es capaz de retrasar el crecimiento del aneurisma, copiando la mayoría de eventos fenotípicos que se han analizado en el modelo deficiente para Lcn2 (crecimiento de vaso, conservación de las células vasculares, disminución del infiltrado de neutrófilos y de la actividad MMP), pero no en el daño a las capas de elastina. Las diferencias en el daño de las capas de elastina puede ser debido a que el tratamiento es temporal, mientras que la deficiencia de Lcn2 en el ratón KO es permanente; por lo que puede tener efectos colaterales que no podemos mimetizar mediante un tratamiento puntual y además, hay que recalcar que las series de animales son diferentes por lo que puede haber pequeñas diferencias en el comportamiento fenotípico.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1.- Reducción de la formación de AAA en los ratones KO Lcn2.

A, Cuantificación relativa de los niveles séricos de Lcn2 en ratones sanos y ratones 14 días post-perfusión de elastasa (Sano N=12; $6,38 \pm 0,74$ vs. AAA N=11; $11,21 \pm 1,99$ U.R., $p < 0,05$).

B, Cuantificación de las lesiones de AAA en C57BL/6J y Lcn2 KO a los 14 días post-perfusión (C57BL/6J N=12; $130,6 \pm 9,7$ vs. Lcn2-/- N=11; $59,4 \pm 8,3$ %; $p < 0,001$ and C57BL/6J-Control N=6; $30,9 \pm 2,4$ vs. Lcn2-/- Control N=6; $32,5 \pm 7,1$ %, $p > 0,05$).

C, Cuantificación de la degradación de las capas de elastina mediante tinción de Verhoeff-van Gieson (C57BL/6J N=12; $3,25 \pm 0,18$ vs. Lcn2-/- N=11; $2,54 \pm 0,21$ grade, $p < 0,05$).

D, Cuantificación del grado de daño en las células de músculo liso vascular mediante tinción de α -actina en lesiones de AAA (C57BL/6J N=12; $3,50 \pm 0,80$ vs. Lcn2-/- N=11; $2,46 \pm 0,69$ grado, $p < 0,05$).

Los valores están representados como MEDIA \pm ES, * $p < 0,05$ vs. C57BL/6J y *** $p < 0,001$ vs. C57BL/6J.

Figura 2.- Los ratones deficientes para Lcn2-/- presentan menor contenido en polimorfonucleares y menor actividad MMP.

A, Cuantificación de la tinción de polimorfonucleares en lesiones de AAA (Ly-6B.2) (C57BL/6J N=12; $6,54 \pm 1,19$ vs. Lcn2-/- N=11; $0,40 \pm 0,17$ % área total; $p = 0,001$).

B, Cuantificación de la tinción de linfocitos en lesiones de AAA (CD3) (C57BL/6J N=12; $114,4 \pm 22,0$ vs. Lcn2-/- N=11; $114,9 \pm 14,2$ células CD3+/mm²).

C, Cuantificación de la tinción de monocitos/macrófagos (MOMA-2) en AAA (C57BL/6J N=7; $32,3 \pm 1,9$ vs. Lcn2-/- N=10; $30,2 \pm 3,3$ % total área).

D, Cuantificación de la actividad MMP mediante inyección de la sonda MMPsense-680 en lesiones de AAA (C57BL/6J N=5; 2.74 ± 0.48 vs. Lcn2^{-/-} N=7; 0.69 ± 0.22 pmol actividad MMP; $p < 0.05$).

Los valores están representados como MEDIA \pm ES, ** $p < 0,01$ vs. C57BL/6J y
5 *** $p < 0,001$ vs. C57BL/6J.

Figura 3.- El tratamiento con anticuerpo neutralizante anti-Lcn2 disminuye las lesiones aneurismáticas.

A, Cuantificación de las lesiones de AAA en ratones C57BL/6J tratados con un anticuerpo control (IgG) o el anticuerpo terapéutico anti-Lcn2, a los 14 días post-perfusión (IgG N=11; $102,0 \pm 13,6\%$ vs. anti-Lcn2 N=8; $43,0 \pm 7,9$ $p < 0,001$).

B, Cuantificación de la degradación de las capas de elastina mediante tinción de Verhoeff-van Gieson (IgG N=11; $3,27 \pm 0,14$ vs. anti-Lcn2 N=8; $2,75 \pm 0,16$ $p < 0,05$).

C, Cuantificación del grado de daño en las células de músculo liso vascular mediante tinción de α -actina en lesiones de AAA (IgG N=11; $3,91 \pm 0,09$ vs. anti-Lcn2 N=8; $3,50 \pm 0,27$, $p > 0,05$).

Los valores están representados como MEDIA \pm ES, * $p < 0,05$ vs. IgG y *** $p < 0,001$ vs. IgG.

Figura 4.- El tratamiento con anticuerpo neutralizante anti-Lcn2 emula el fenotipo del ratón deficiente para Lcn2.

20 A, Cuantificación de la tinción de polimorfonucleares en lesiones de AAA (Ly-6B.2). (IgG N=11; $3,76 \pm 1,03$ vs. anti-Lcn2 N=8; $1,69 \pm 0,39$ % área total, $p = 0,05$).

B, Cuantificación de la actividad MMP mediante inyección de la sonda MMPsense-680 en lesiones de AAA. (IgG N=6; $1,39 \pm 0,17$ vs. anti-Lcn2 N=5; $0,77 \pm 0,09$ pmol actividad MMP, $p < 0,01$).

25 Los valores están representados como MEDIA \pm ES, * $p < 0,05$ vs. IgG y ** $p < 0,01$ vs. IgG.

EJEMPLOS

30 Con la intención de mostrar la presente invención de un modo ilustrativo aunque en ningún modo limitante, se aportan los siguientes ejemplos.

Los ratones deficientes para Lipocalina-2 (Lcn2^{-/-}) fueron donados por Mak Taw (Canadá) y los ratones control de fenotipo salvaje (C57BL/6J) fueron adquiridos a los
35 laboratorios Jackson (Bar Harbor, ME). No se detectaron diferencias en el tamaño o

peso de los ratones durante el desarrollo del modelo. La junta de revisión ética aprobó todos los procedimientos según la normativa vigente.

Ejemplo 1.- Modelo quirúrgico de inducción de AAA.

5 Ratones de 12 semanas de edad fueron anestesiados mediante inhalación de isoflurano al 4% y se mantuvo la sedación con isoflurano al 2% durante todo el procedimiento. Se realizó una laparotomía horizontal y mediante la ayuda de un estereomicroscopio quirúrgico se procedió al aislamiento de la aorta abdominal. Se procedió a la ligación temporal de la sección comprendida entre las arterias renales y
10 las ilíacas. A continuación, se hizo una aortotomía mediante una aguja de 30-gauge y se exanguinó. Se introdujo un tubo de polietileno PE-26 a través de la aortotomía y la aorta fue perfundida a una presión de 100 mmHg con suero salino (operación control) o con elastasa pancreática porcina de tipo I (actividad específica de 6 U/mg proteína; E1250; Sigma-Aldrich) durante 5 minutos. Una vez transcurrido este periodo se
15 procedió a la reparación de la aortotomía y se restauró el flujo sanguíneo. Los ratones operados se dejaron en recuperación y tras 14 días del procedimiento quirúrgico los animales fueron sacrificados, obteniendo suero y aislando el AAA para su posterior análisis. En este modelo para considerar que hay un crecimiento aneurismático significativo se debe producir un incremento del diámetro máximo del vaso de al
20 menos el 100 % del diámetro original.

Ejemplo 2.- Generación y purificación del anticuerpo policlonal neutralizante anti-Lcn2.

Para la generación del anticuerpo policlonal anti-Lcn2 se utilizó un conejo
25 (Orhyctolagus cuniculus, raza New Zealand White) de 8 semanas de edad. Para la inmunización se le administraron 6 inyecciones por vía intramuscular que consistía en 100 µg de la proteína recombinante Lcn2 (Sino Biological, 50060-M08H) diluida en 200 µl de PBS, más 350 µl de adyuvante completo de Freund. Las inyecciones fueron semanales. Pasadas las 6 semanas, se procedió al sangrado en la vena marginal de
30 la oreja derecha y a la obtención del suero; para ello se dejó la sangre en incubación 1h a 37°C y posteriormente toda la noche a 4°C para la formación del coágulo y mediante centrifugación se aisló el suero de conejo con el anticuerpo policlonal (anti-Lcn2). Como control se utilizó el suero de un conejo sin inmunizar (IgG). Posteriormente el suero fue purificado para la obtención de IgGs, para ello se realizó la
35 diálisis del suero en PBS y se purificó mediante columna de proteína A-Sefarosa (GE

Healthcare).

Ejemplo 3.- Determinación de la actividad del anticuerpo policlonal anti-Lcn2.

ELISA anti-Lcn2.

5 Una vez obtenido el suero de conejo se comprobó la capacidad de detección del anticuerpo de reconocer la proteína recombinante Lcn2 inyectada en el conejo. Se tapizó una placa de p96 con 0,5 µg de la proteína recombinante y se probaron diluciones seriadas del suero (1/500 a 1/1.000.000). Cada dilución se testó por duplicado y con un control negativo sin proteína para comprobar la especificidad del
10 marcaje. El marcaje fue revelado con un anticuerpo secundario anti-conejo y ensayo colorimétrico.

Western-Blot del anticuerpo policlonal anti-Lcn2.

Alícuotas (1 µL) de suero de ratón, sano o con AAA, fueron diluidas en PBS hasta un
15 volumen final de 10 µl. Las muestras se resolvieron en geles de poliacrilamida desnaturalizantes con SDS al 10% (p/v). Las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF (Immobilion-P; Milipore) y se bloquearon con 10% (p/v) de leche en polvo en TBS-T (0,01 M Tris pH=7,7, 0,1 NaCl y 0,1 % Tween 20). La membrana con un anticuerpo comercial anti-Lcn2 a una dilución 1:1000 (Santa Cruz sc-18698, 1
20 µg/ml) a 4°C durante la noche. Posterior a la incubación con el anticuerpo primario las membranas fueron incubadas con un anticuerpo secundario conjugado HRP anti-cabra (Dako) a una dilución 1:1000. Las proteínas fueron detectadas por quimioluminiscencia mejorada (ECL Western Blotting Detection Reagents, Amersham Biosciences) y se cuantificó cuando procedió mediante densitometría (Quantity One; Bio-Rad
25 Laboratories). Se utilizó un marcador de proteínas preteñido (PageRuler Prestained Protein Ladder, Fermentas) para determinar la masa molecular de las bandas.

Ejemplo 4.- Modelo terapéutico anti-Lcn2.

Para demostrar el papel de Lcn2 en el desarrollo de AAA se realizó la inyección del
30 anticuerpo neutralizante anti-Lcn2 o el anticuerpo control anti-IgG en ratones de 12 semanas. Se inyectó por vía intravenosa una dosis de 100 µg de anticuerpo 24 horas antes de la operación de inducción de aneurismas anteriormente descrita y en los días 5 y 10 post-cirugía. Al igual que se ha descrito anteriormente, los ratones operados fueron sacrificados 14 días tras el procedimiento quirúrgico y se aisló el AAA para
35 posterior análisis.

Ejemplo 5.- Histomorfometría y análisis inmunohistoquímico.

Las muestras de AAA fueron incluidas en OCT y congeladas. Se realizaron cortes seriados de 5 μm de grosor para su posterior análisis mediante histomorfometría e inmunohistoquímico. La histomorfometría fue realizada en secciones teñidas mediante tricrómico de Masson. Mediante tinción de Verhoeff Van Giesson se cuantificó la preservación de las capas de elastina y fue clasificada de la siguiente forma: grado 1, láminas intactas, bien organizadas; grado 2, láminas con pequeñas interrupciones y rupturas; grado 3, las capas de elastina tienen múltiples interrupciones y rupturas y grado 4, fragmentación severa de las capas de elastina y faltan secciones enteras.

Se realizó el análisis de células inflamatorias infiltrantes mediante tinción de MOMA-2 (macrófagos), CD3 (linfocitos) y Ly-6B.2 (neutrófilos). Además, se caracterizó la presencia de células de músculo liso vascular (α -Actina). Como controles negativos se utilizaron IgGs equivalentes para comprobar que la tinción era específica. Se utilizaron anticuerpos secundarios biotilados, se añadió AB-Complex/HRP y posteriormente las secciones fueron teñidas con 3,30-diaminobencidina. Los cortes histológicos fueron montados en DPX excepto para las células vasculares en las que el anticuerpo estaba conjugado con un fluoróforo (Cy3). El contenido relativo de macrófagos y neutrófilos fue cuantificado por área positiva; mientras que las células CD3⁺ fueron cuantificadas como células positivas/ mm^2 de sección aórtica. La preservación de las células vasculares fue clasificada mediante la siguiente graduación: grado 1, intacta; grado 2, mínimas aberraciones; grado 3, pérdida de pequeñas secciones vasculares y grado 4, daño severo en áreas prolongadas.

25

Ejemplo 6.- Tomografía de fluorescencia molecular.

La tomografía de fluorescencia molecular fue realizada con un sistema FMT1500 (VisEn Medical, Perkin-Elmer, USA). Para detectar la actividad MMP asociada al remodelado vascular, inyectamos una sonda de imagen no invasiva MMPsense-680 (VisEn; 5 nmol en 150 μL en tampón fosfato; longitud de excitación 680 ± 10 nm, longitud de emisión 700 ± 10 nm), 24 horas antes de la toma de las imágenes, el día 13 post-operación. Las imágenes fueron adquiridas y la actividad MMP fue evaluada mediante la ayuda del paquete de software FMT1500.

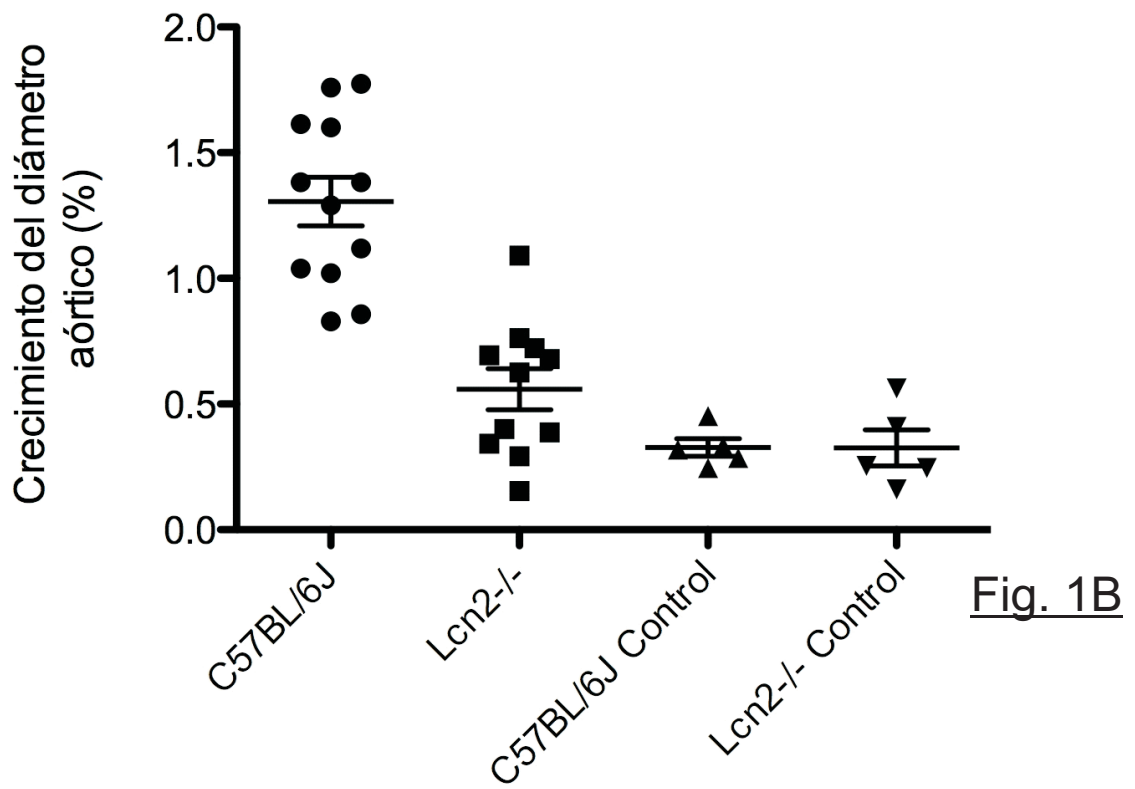
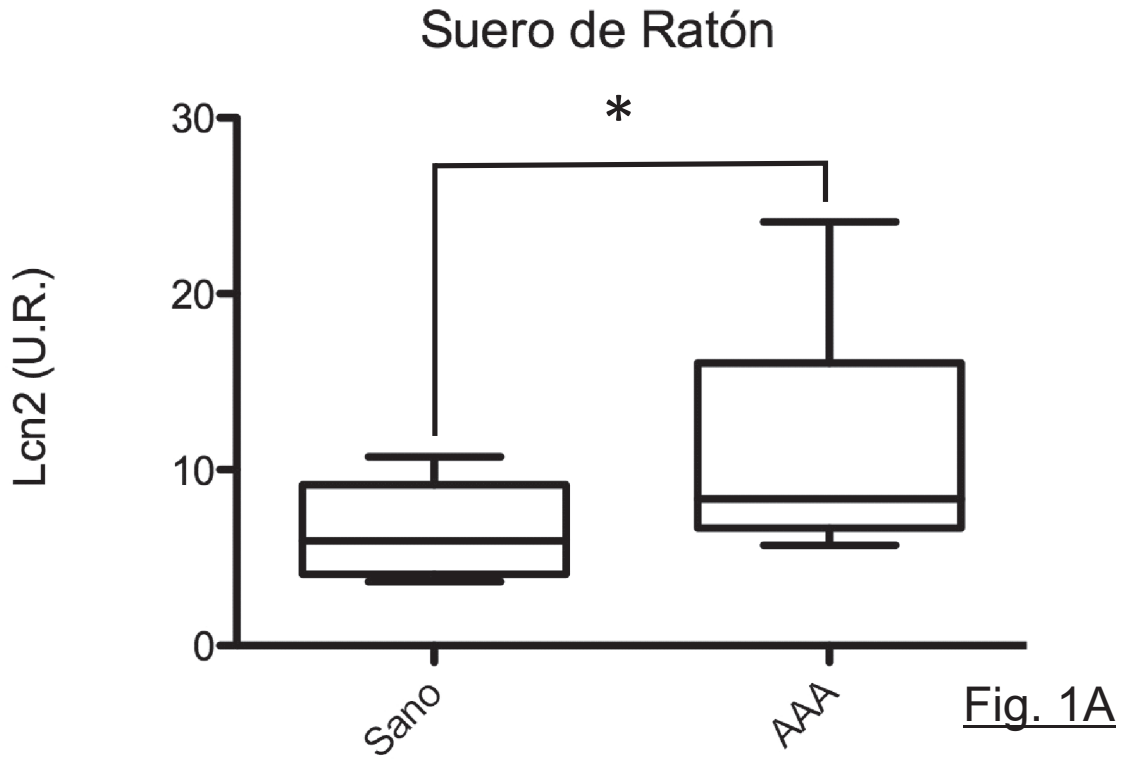
Ejemplo 7.- Análisis estadístico.

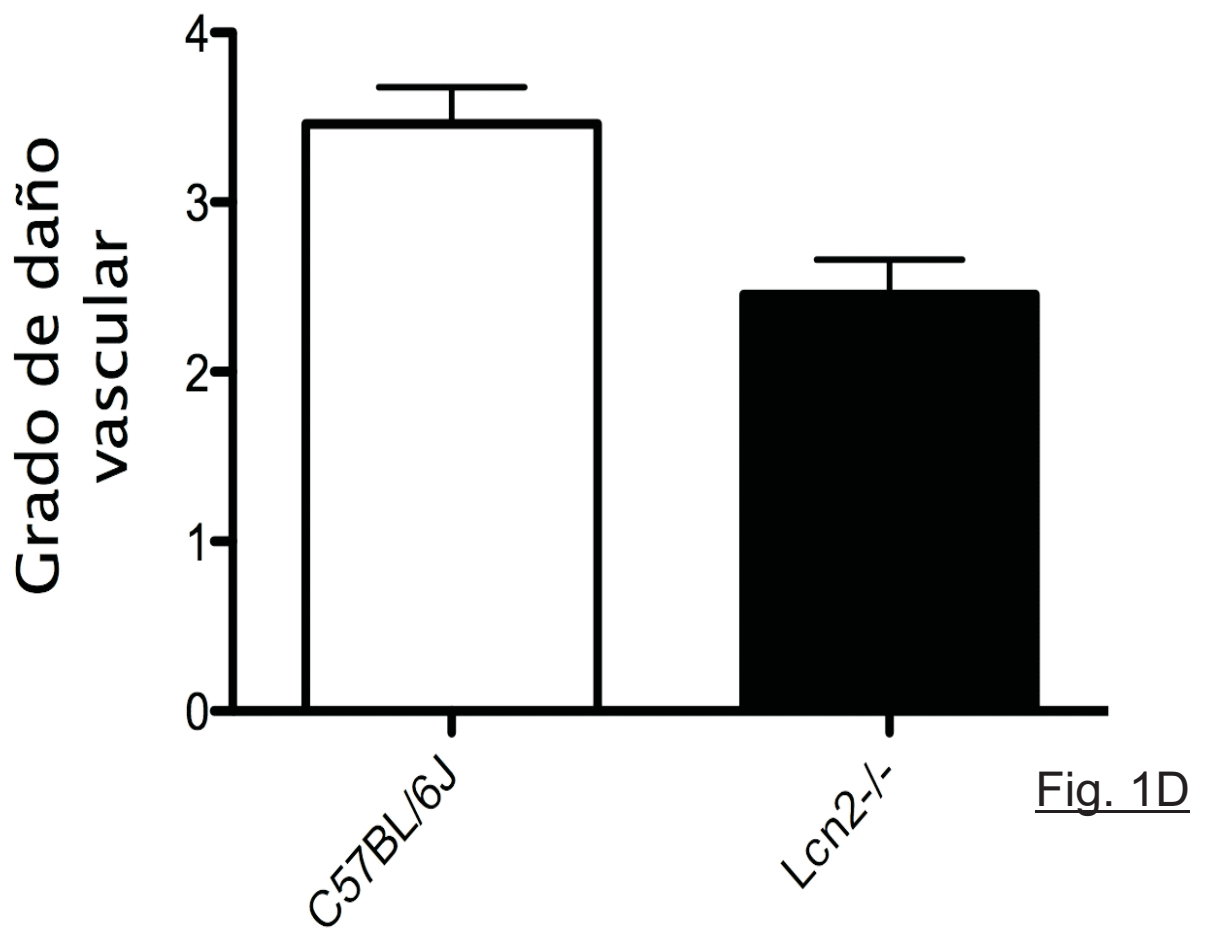
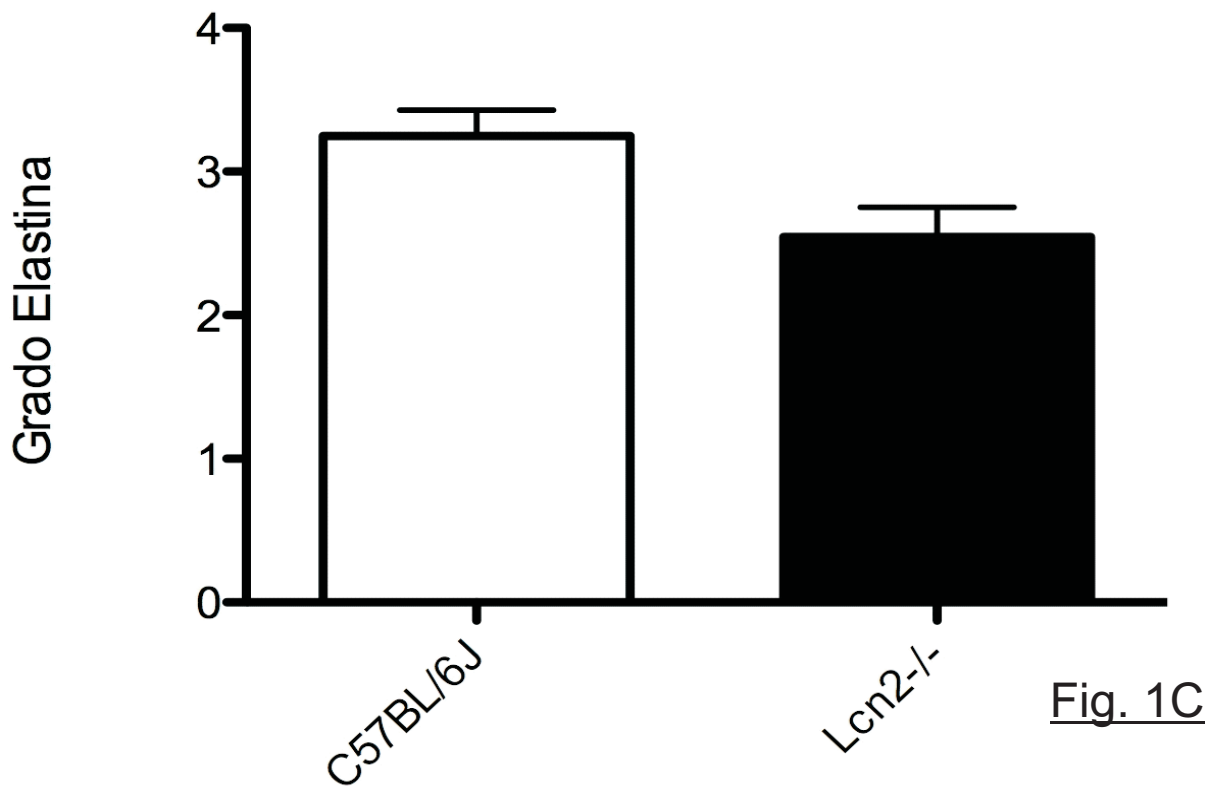
35

Los resultados de los experimentos han sido representados como valor medio \pm error estándar. El análisis estadístico fue realizado mediante el uso del software SPSS 20.0 y analizados mediante prueba t y la incidencia de aneurismas se calculó mediante análisis por Chi-cuadrado. Se considera que hay significación estadística cuando el valor de p es igual o inferior a 0,05.

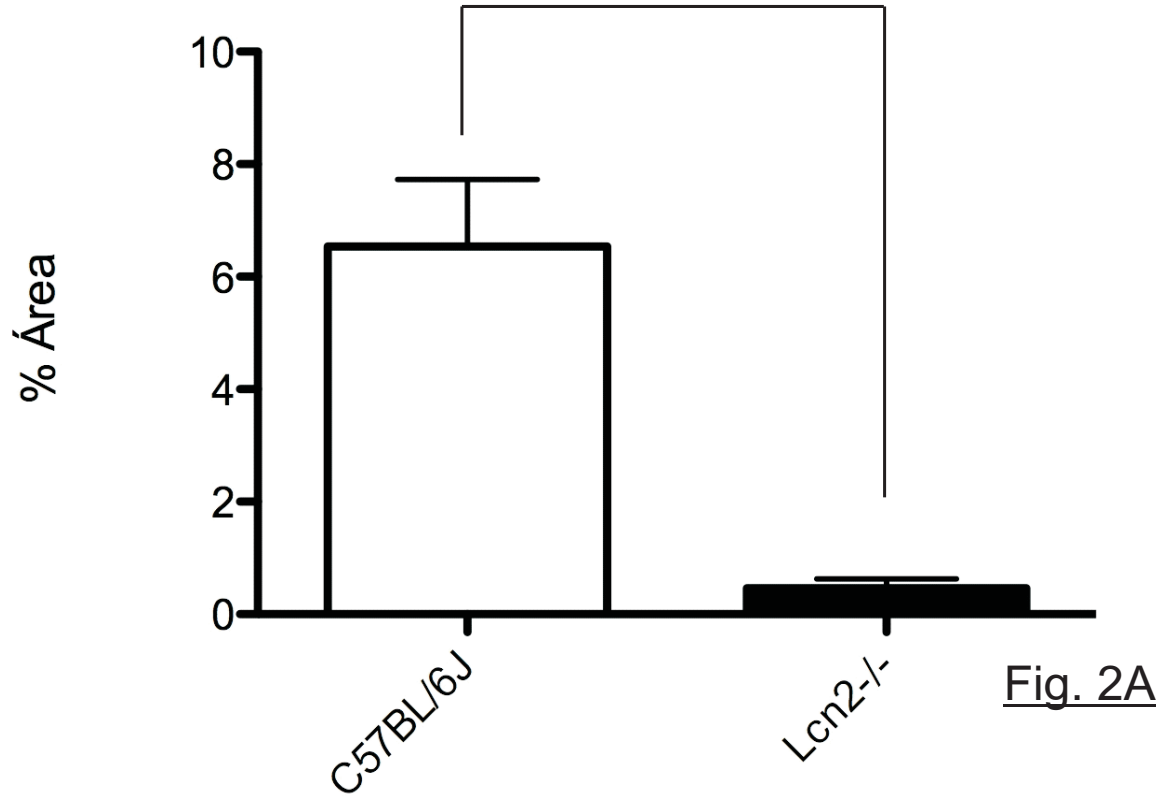
REIVINDICACIONES

1. Uso de un anticuerpo capaz de unirse a lipocalina-2 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de aneurisma aórtico abdominal.
- 5 2. Uso según la reivindicación 1, en que dicho anticuerpo es un anticuerpo policlonal.
3. Uso de una molécula de ácido nucleico anti-sentido capaz de inhibir la expresión del gen de lipocalina-2 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de aneurisma aórtico abdominal.
- 10 4. Uso según la reivindicación 2, en que dicho ácido nucleico es un ARN interferente silente.

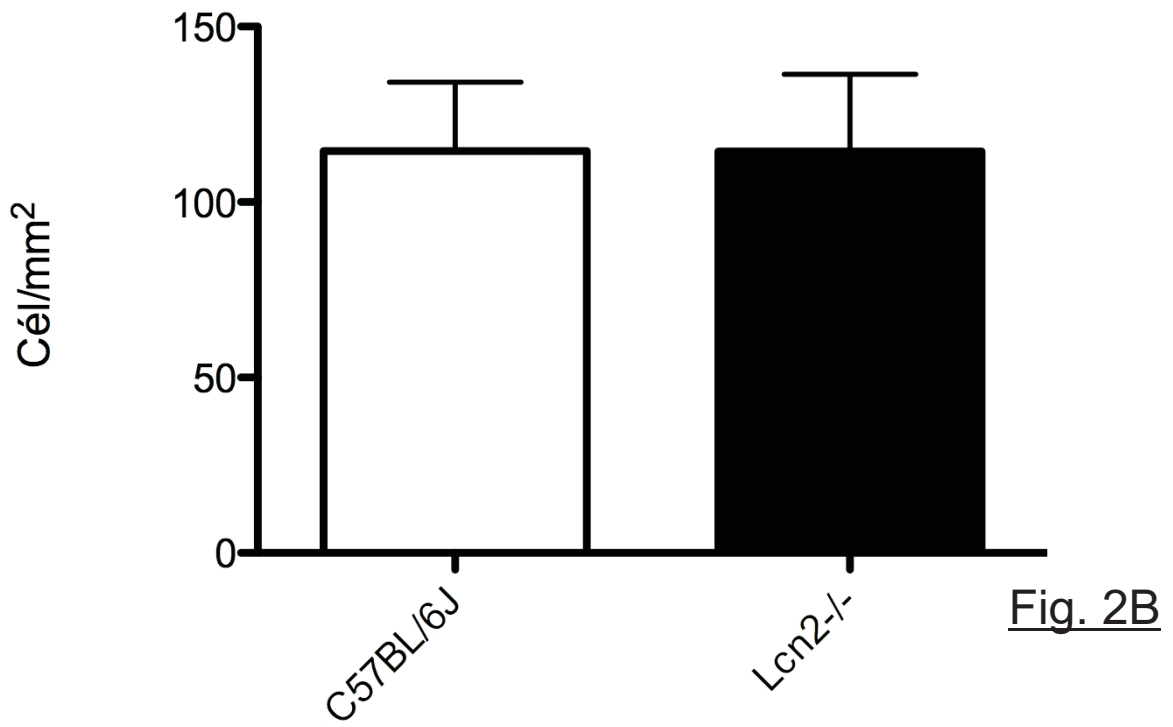


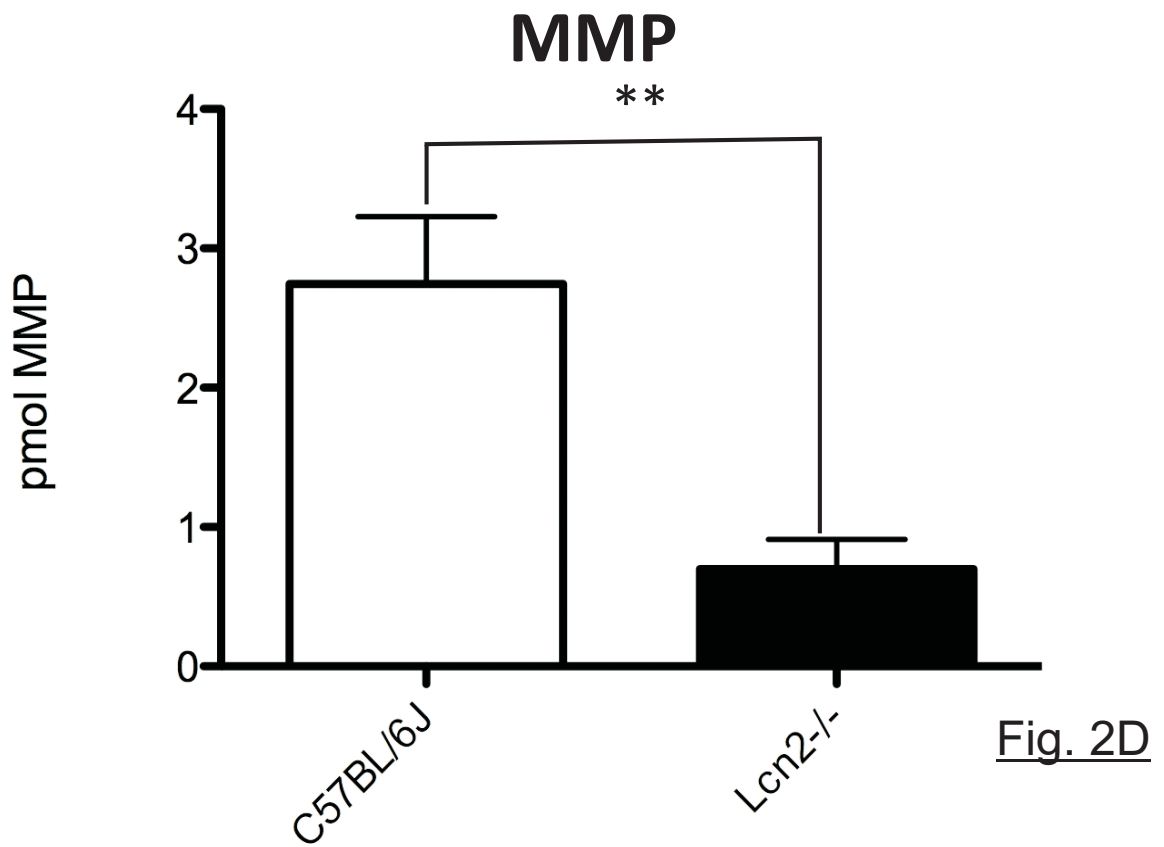
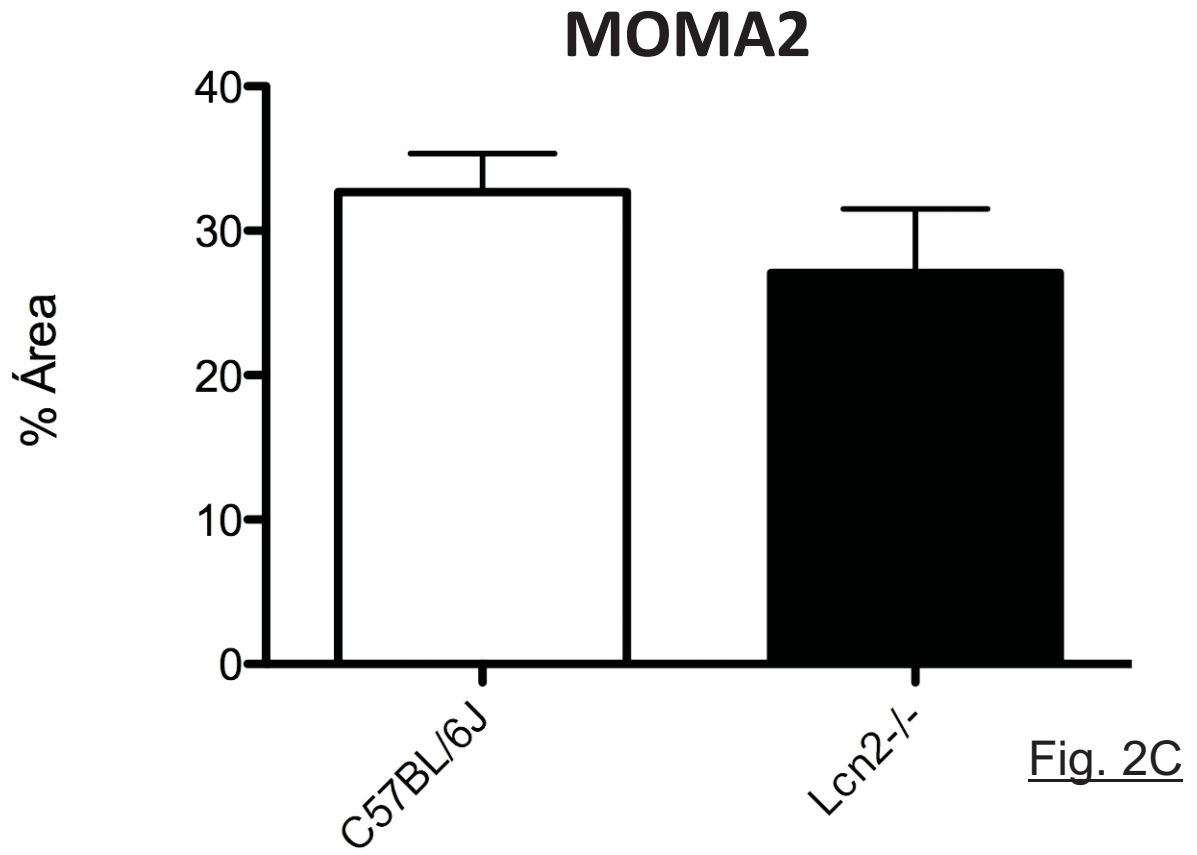


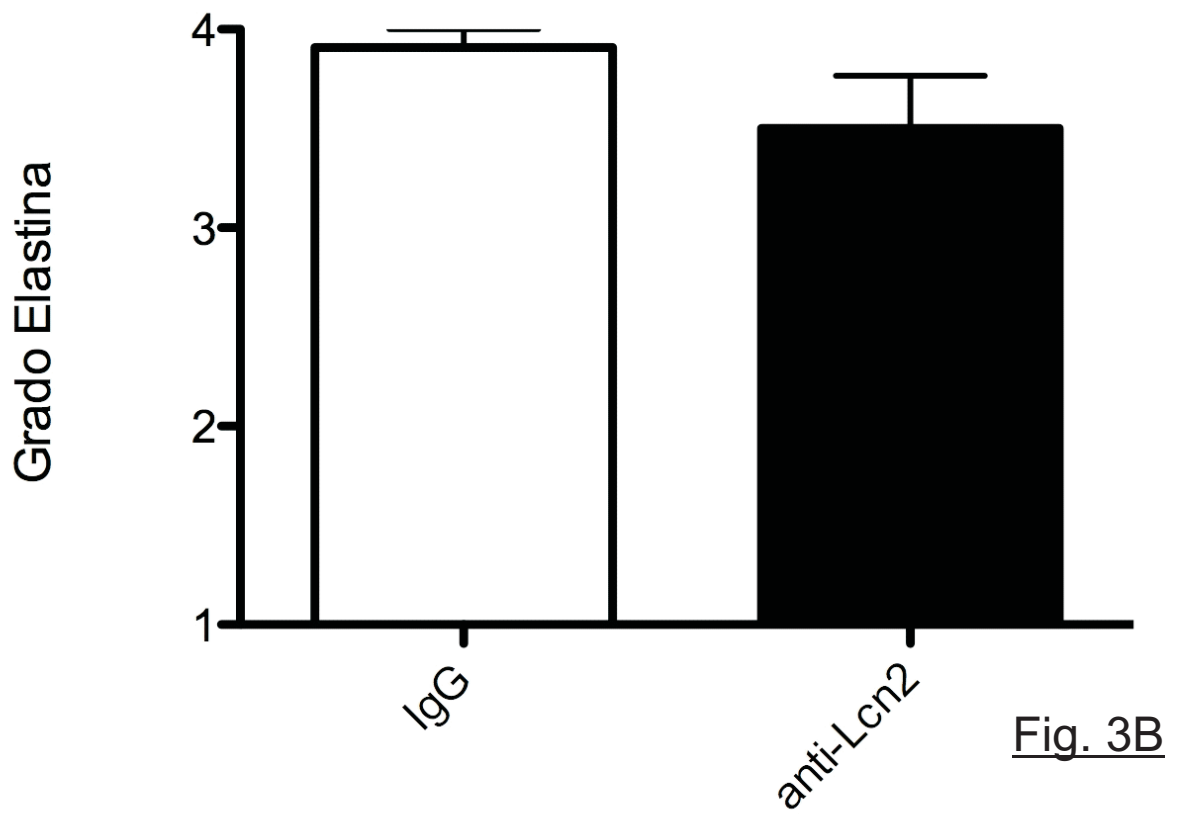
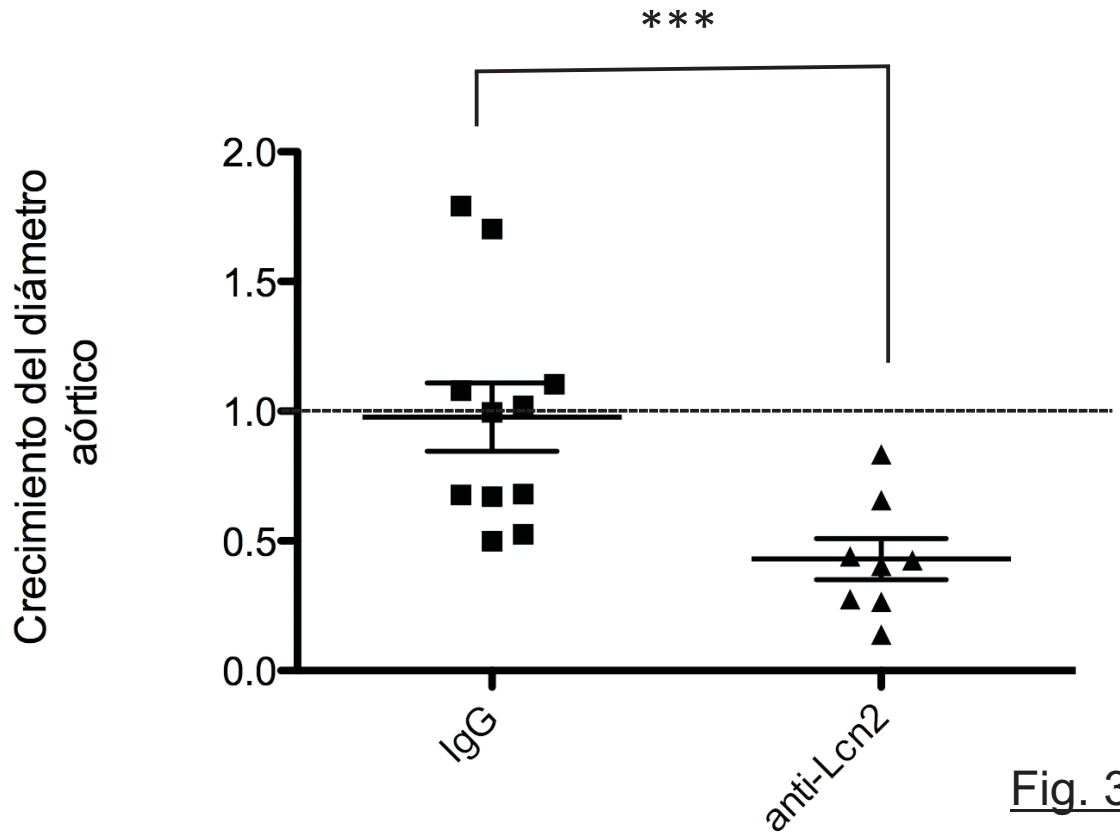
Ly-6B.2



CD3







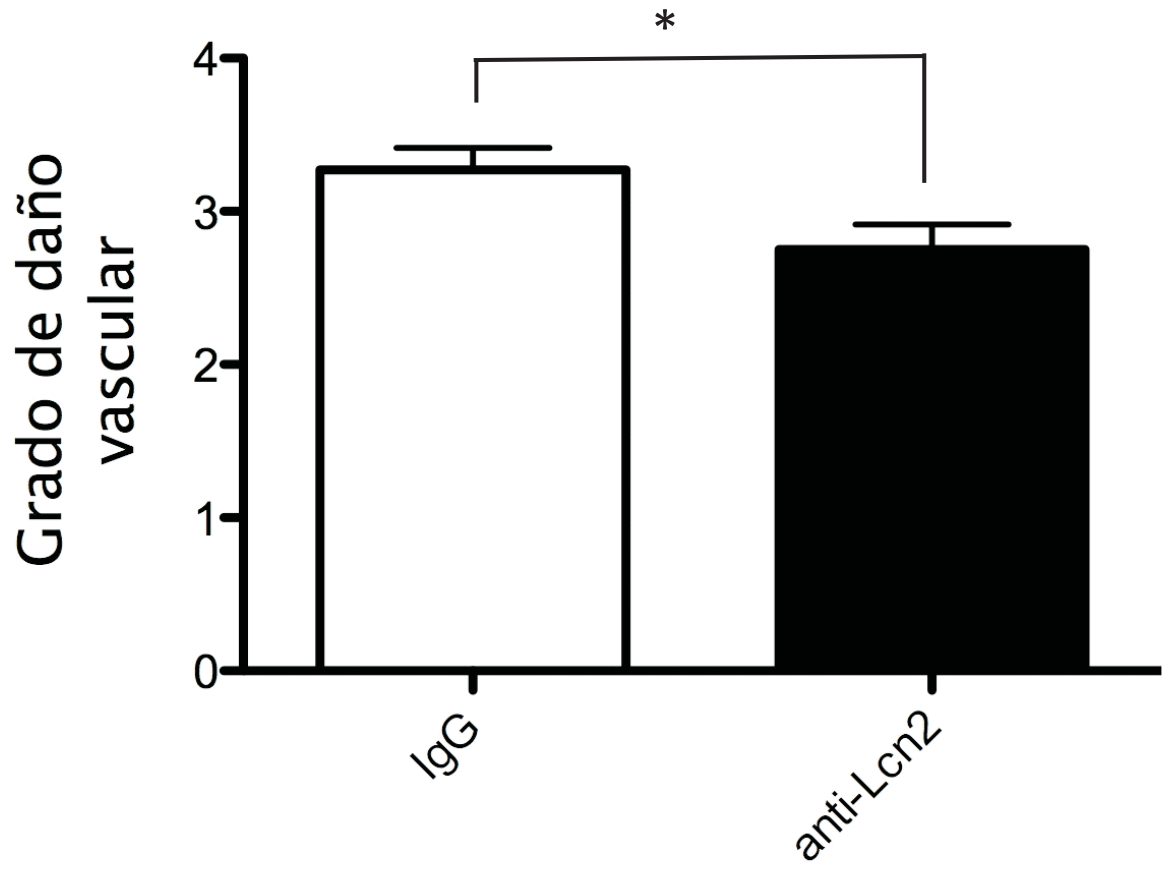


Fig. 3C

Ly-6B.2

*

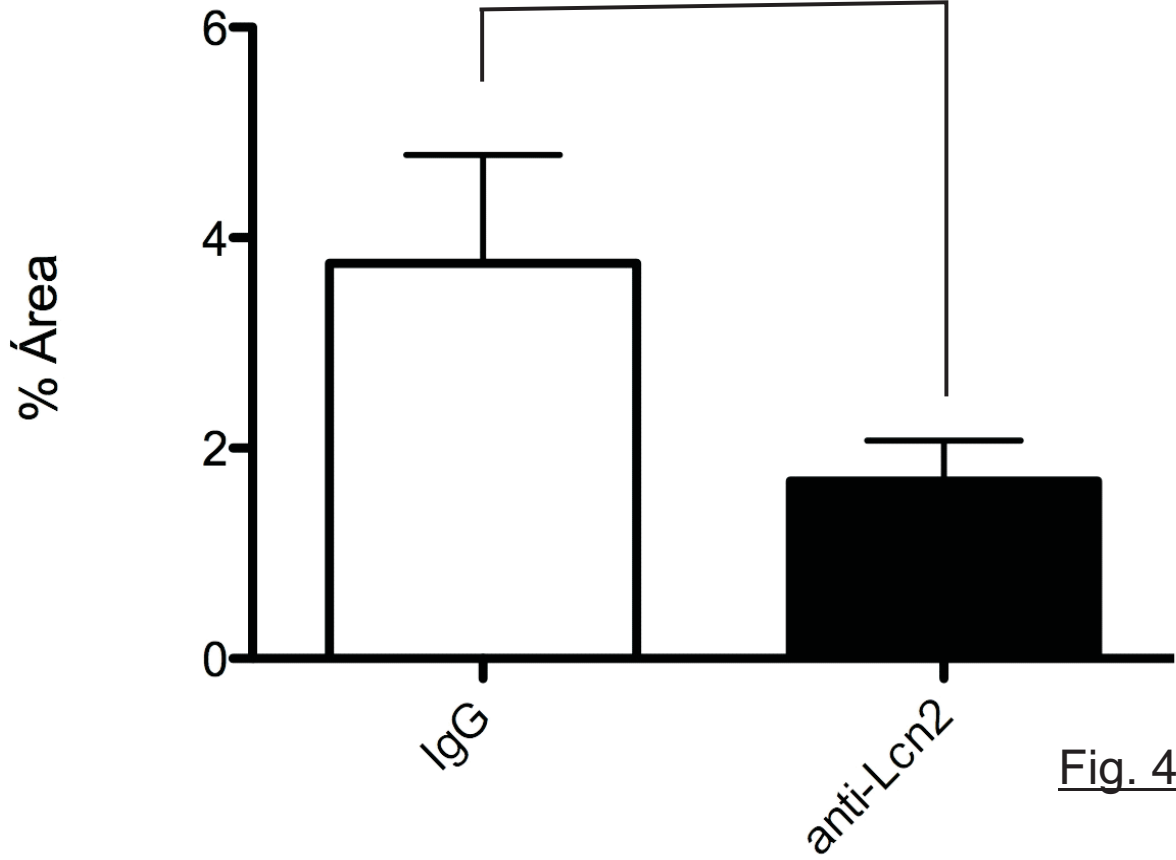


Fig. 4A

MMP

**

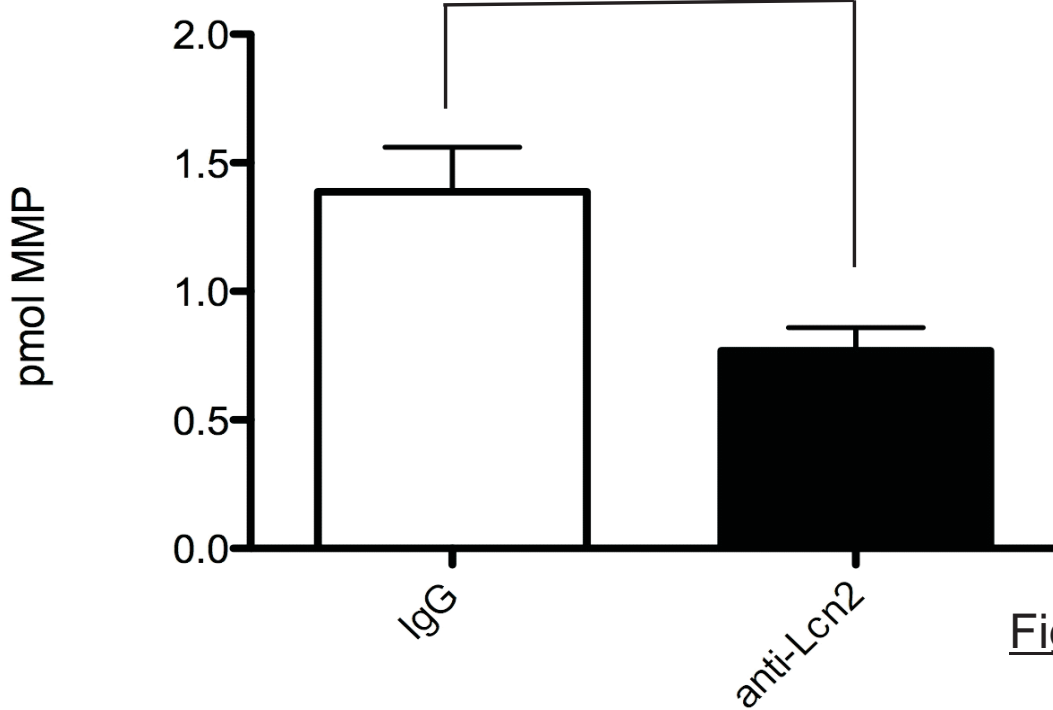


Fig. 4B



②① N.º solicitud: 201431737

②② Fecha de presentación de la solicitud: 24.11.2014

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 2010127294 A2 (ABBOTT LAB et al.) 04.11.2010, reivindicaciones.	1-4
A	RAMOS-MOZO PRISCILA et al. Increased plasma levels of NGAL, a marker of neutrophil activation, in patients with abdominal aortic aneurysm. ATHEROSCLEROSIS 2012. VOL: 220 No: 2 Págs: 552-556 ISSN 0021-9150 Doi: doi:10.1016/j.atherosclerosis.2011.11.023.	1-4

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
23.03.2016

Examinador
J. Manso Tomico

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07K16/18 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61K48/00 (2006.01)

C12P21/08 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07K, A61K, C12P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, EMBASE, BIOSIS.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 23.03.2016

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-4	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-4	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2010127294 A2 (ABBOTT LAB et al.)	04.11.2010
D02	RAMOS-MOZO PRISCILA et al. Increased plasma levels of NGAL, a marker of neutrophil activation, in patients with abdominal aortic aneurysm. ATHEROSCLEROSIS 2012. VOL: 220 No: 2 Págs: 552-556 ISSN 0021-9150 Doi: doi:10.1016/j.atherosclerosis.2011.11.023.	

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud se refiere al uso de un anticuerpo anti-lipocalina-2 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del aneurisma aórtico abdominal, según las reivindicaciones 1, 2. También se refiere al uso de una molécula de ácido nucleico anti-sentido capaz de inhibir la expresión del gen de lipocalina-2 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del aneurisma aórtico abdominal, según reivindicaciones 3, 4.

D01 divulga un anticuerpo de unión a la proteína lipocalina (Lcn2, o NGAL).

D02 muestra un estudio en que los pacientes con aneurisma abdominal aórtico (AAA) tenían cantidades significativamente mayores de lipocalina (NGAL) en comparación con pacientes control. La Lipocalina-2 es liberada por los neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) y por los trombos formados en la parte luminal de los pacientes afectados de AAA. Los niveles plasmáticos de NGAL se incrementaron en pacientes con AAA en comparación con sujetos sanos y correlacionan con el crecimiento del AAA.

Ninguno de los documentos del estado de la técnica divulga el objeto de la invención que aparece en las reivindicaciones 1-4, por lo que cumplirían con el requisito de novedad tal y como se menciona en el artículo 6 de la ley 11/1986.

Sin embargo, las reivindicaciones 1-4 carecerían de actividad inventiva tal y como se menciona en el art. 8 de la ley 11/1986. Tomando en consideración D01 como el documento del estado de la técnica más cercano al objeto de la invención, la diferencia entre ambos documentos sería la capacidad terapéutica contra el AAA, de un anticuerpo anti-lipocalina 2. El efecto técnico producto de esa diferencia sería la fabricación de un medicamento contra el aneurisma aórtico abdominal (AAA). Por tanto, el problema técnico planteado por la presente invención podría definirse como la provisión de un medicamento para el tratamiento del AAA, y la solución propuesta un anticuerpo anti-lipocalina-2, y un ARN interferente. Sin embargo, ninguno de los dos compuestos resuelve el problema técnico planteado, en todo el alcance de las reivindicaciones, y por tanto no supondría realmente una aportación al estado de la técnica. Tal y como se menciona en el ejemplo 4 de la descripción, para demostrar el papel de Lcn2 en el desarrollo de AAA, se inyectó el anticuerpo anti-Lcn2 antes de la operación de inducción del aneurisma en animales C57BL/6J, comprobándose la disminución, en cuanto a la incidencia del aneurisma, con respecto a los ratones tratados con un anticuerpo control. Pero esto demuestra el efecto del anti-Lcn2 con respecto a la inducción de un aneurisma, pero no demuestra la capacidad terapéutica del anti-Lcn2 en casos donde el aneurisma está ya formado, es decir, no se muestran resultados que permitieran comprobar cuál sería la capacidad del anticuerpo de revertir un aneurisma ya formado, cuando el anticuerpo se inyectase después de producirse el aneurisma. Así pues, lo que demuestra este estudio sería la capacidad preventiva de los anti-Lcn2 en cuanto al desarrollo del aneurisma, pero no la capacidad terapéutica de los anti-Lcn2 en cuanto a la reversión o curación de una situación de aneurisma ya formado. Respecto al ARN interferente, puesto que no hay datos en la descripción que permitan valorar la capacidad terapéutica de estos compuestos, las reivindicaciones 3, 4 tampoco supondrían una solución al problema técnico planteado.